

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 05 JUL 2004

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:**

10 2004 005 783.4

**Anmeldetag:**

04. Februar 2004

**Anmelder/Inhaber:**

novosom AG, 06120 Halle/DE

**Bezeichnung:**

Injizierbare liposomale Depots zum Peptid- &  
Proteindelivery

**Priorität:**

09. Mai 2003 DE 103 21 263.9

**IPC:**

A 61 K 9/127

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. Juni 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

**Dzierzon**

BEST AVAILABLE COPY

Deutsche Patentanmeldung



*[Handwritten signature]*

5

**Injizierbare liposomale Depots zum Peptid- & Proteindelivery**

10

15

20

25

30

**35 Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft liposomale Formulierungen zur Herstellung eines injizierbaren Depots von Peptid- und Proteinwirkstoffen zur langanhaltenden Freisetzung und Wirkung in einem Säugerkörper.

## Stand der Technik

Peptid- und Proteinwirkstoffe werden im Körper nach Applikation sehr schnell abgebaut oder ausgeschieden und müssen daher durch wiederholte Injektionen verabreicht werden. Um die „patient compliance“ zu erhöhen wird ein geeignetes Deliverysystem benötigt, das den Wirkstoff im Körper vor Abbau schützt und ihn nur langsam in die Blutbahn freigibt. Dazu werden Depotsysteme eingesetzt, die subkutan oder intramuskulär injiziert oder implantiert werden. Liposomen sind eine mögliche Form eines solchen Trägersystems. Sie sind aufgebaut aus einer oder mehreren Lipid-Doppelschichten und umschliessen in ihrem Innern ein wässriges Kompartiment, in welches wasserlösliche Substanzen eingeschlossen werden können. In die Lipid-Doppelschicht können lipophile Substanzen eingebaut werden.

In J. Controll. Rel. 64 (2000) 155-166, in der US 5766627 und anderen Schriften der Autoren werden multivesikuläre Aggregate aus Liposomen als injizierbares Depotsystem für Insulin, Leuprolide und Enkephalin vorgestellt, die durch einen Doppelemulsionsprozess gewonnen werden. Wegen des Zusatzes unpolarer Triglyceride sind diese multizentrischen Aggregate nicht als Liposomen im engeren Sinne aufzufassen, da die Triglyceride keine Bilayermembranen bilden und nicht in solche eingebaut werden. Nachteilig ist weiterhin die Nutzung einer mit Wasser nicht mischbaren Ölphase zur Herstellung der Strukturen. Insbesondere beim Einschluss grösserer Proteine führt das zur Denaturierung an der Grenzfläche. Ebenso stellen Reste organischer Lösungsmittel ein nicht zu unterschätzendes regulatorisches Problem dar.

Für Depotsysteme finden nach dem Stand der Technik Liposomen Verwendung, die aus neutralen, anionischen oder PEG-Lipiden zusammengesetzt sind, etwa in der WO 9920301 für ein Depot von  $\gamma$ -Interferon, in Diabetes 31 (1982), 506-511 für ein Depot von Insulin; weiterhin in Proc. Natl. Acad. Sci. 88 (1991), 10440-10444 zur Vakzinierung.

In BBA 1328 (1997), 261-272 werden verschiedene liposomale Systeme (unilamellar und multilamellar) aus Ei-PC, Ei-PG, DPPC, DPPG, PS und Cholesterol auf deren Aufnahme ins Lymphsystem und der Bioverteilung

nach subkutaner Gabe hin untersucht. Der Review-Artikel Advanced Drug Delivery Reviews 50 (2001), 143-156 schliesst an diese Untersuchungen an. Hier wird gezeigt, dass kleinere Liposomen (<150nm) aus einem subkutanen Depot in die Lymphe auswandern.

Nach dem Stand der Technik werden neutrale und negativ geladene Liposomen für liposomale Depotsysteme verwendet. Die Liposomen müssen eine Mindestgrösse aufweisen, um nicht in die Lymphe abzuwandern.

Die Herstellung grosser Liposomen von deutlich mehr als 150nm ist aber mit technischen und regulatorischen Schwierigkeiten verbunden. Insbesondere ist dann die wünschenswerte Sterilfiltration der Artikel nach deren Herstellung nicht mehr möglich.

Aufgabe der Erfindung war es nun, neue stabile liposomale Depotformulierungen bereitzustellen, die eine langfristige Freisetzung des Wirkstoffes über mindestens eine Woche erreichen, keinen oder nur vernachlässigbaren „burst release“ zeigen und eine gute Verträglichkeit im Organismus aufweisen.

#### Zusammenfassung der Erfindung

Die Aufgabe wird gelöst durch die Formulierung der Wirkstoffe in Liposomen, die insbesondere bei der Anwendung als Depot in Form von Aggregaten vorliegen. Solche Liposomen umfassen in einer Ausführung der Erfindung neben neutralen Lipiden auch kationische Lipide.

Die Erfindung basiert auf der Beobachtung, dass positiv geladene Liposomen gut mit Komponenten des Serums oder der Interstitialflüssigkeit aggregieren und in diesem Zustand an der subkutanen oder intramuskulären Einstichstelle verbleiben müssen. Ein Wegdiffundieren des Depots von der Einstichstelle wird damit vermieden.

## Ausführliche Beschreibung der Erfindung

In einer bevorzugten Ausführung der vorliegenden Erfindung werden Liposomen, die aus neutralen und kationischen Lipiden aufgebaut sind, als liposomales Depotsystem für die verzögerte Freisetzung von therapeutischen Peptiden und Proteinen verschiedenster Molmassen eingesetzt.

Der Review-Artikel J. Pharm. Sci., 89 (3), 297-310, 2000 gibt absolute Bioverfügbarkeiten verschieden großer Peptide und Proteine nach subkutaner Applikation an, wobei mit zunehmender Molmasse keine signifikante Verringerung der Bioverfügbarkeit beobachtet wird. Depotsysteme für Membranproteine fallen nicht unter die erfinderische Lehre.

Da therapeutische Peptide und Proteine im Körper sehr schnell abgebaut werden, müssen diese durch wiederholte Injektionen verabreicht werden. Die für diese Ausführung der Erfindung relevanten Peptide und Proteine, deren Analoga, zugehörige Peptide, Fragmente, Inhibitoren und Antagonisten, umfassen:

Transforming growth factors (TGF-alpha, TGF-beta), Interleukine (z.B. IL-1, IL-2, IL-3), Interferone (IFN-alpha, IFN-beta, IFN-gamma), Calcitonine, Insulin-like growth factors (IGF-1, IGF-2), Parathyroid hormone, Granulozyten-stimulierender Faktor (G-CSF), Granulozyten-Makrophagen stimulierender Faktor (GM-CSF), Makrophagen stimulierender Faktor (M-CSF), Erythropoetin, Insuline, Amyline, Glucagone, Lipocortine, Wachstumshormone, Somatostatin, Angiostatin, Endostatin, Octreotid, Gonadotropin releasing hormone (GnRH), Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) und wirksame Agonisten wie Leuprolidacetat, Buserelin, Goserelin, Triptorelin; Platelet-derived growth factor; Blutgerinnungsfaktoren (z.B. Faktor VIII, Faktor IX), Thromboplastin-Aktivatoren, Gewebe Plasminogen Aktivatoren, Streptokinase, Vasopressin, Muramyl-dipeptide (MDP), Atrial natriuretic factor (ANF), Calcitonin gene-related Peptid (CGRP), Bombesin, Enkephaline, Enfuvirtide, Vasoaktives intestinales Peptid (VIP), Epidermal growth factor (EGF), Fibroblast growth factor (FGF), Growth hormone releasing hormone (GRH), Bone morphogenetic proteins (BMP), Antikörper und Antikörperfragmente (z.B. scFv-Fragmente, Fab-Fragmente), Peptid T und Peptid T Amide, Herpes Virus Inhibitor, Virus Replikations Inhibitions Faktor, Antigene und Antigenfragmente, lösliches CD4, ACTH und Fragmente,

Angiotensine, und ACE Inhibitoren, Bradykinin (BK), Hypercalcemia malignancy factor (PTH like adenylate cyclase-stimulating protein), beta-casomorphins, chemotactic peptides and inhibitors, corticotropin releasing factor (CRF), caerulein, cholecystokinins +  
5 Fragmente und Analoga, Galanin, gastric inhibitory polypeptide (GIP), gastrins, gastrin releasing peptide (GRP), motilin, PHI peptides, PHM peptides, peptide YY, secretins, melanocyte stimulating hormone (MSH), neuropeptide Y (NPY), neuromedins, neuropeptide K, neurotensins, phosphate acceptor peptide (c-AMP  
10 protein kinase substrates), Oxytocine, substance P, TRH - sowie Fragmente, Analoga und Derivate dieser Stoffe.

15 Neben Peptiden und Proteinen sind auch Kohlenhydrate wie z.B. Heparin für diese Erfindung relevante Wirkstoffmoleküle.

Für die Herstellung der Liposomen werden nach dem Stand der Technik etablierte Verfahren, wie Extrusion durch Polycarbonat-Membranen, Ethanolinjektion oder Hochdruckhomogenisation verwendet.

20 Als Liposomenbildner kommen membranbildende und membranständige Lipide in Frage, wobei diese natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein können. Hierzu zählen insbesondere Cholesterol und Derivate, Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine als neutrale Lipide. Besonders bevorzugt werden die vollständig gesättigten  
25 Verbindungen dieser Klasse verwendet, wie beispielsweise die Dimyristoyl-, Dipalmitoyl- oder Distearoyl-derivate der Phosphatidylcholine und Phosphatidylethanolamine.

30 Kationische Lipide zur Ausführung der Erfindung umfassen beispielsweise:

DAC-Chol 3-β-[N-(N,N'-dimethylaminoethane) carbamoyl]cholesterol

DC-Chol 3-β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane) carbamoyl]cholesterol

35 TC-Chol 3-β-[N-(N',N', N'-trimethylaminoethane) carbamoyl] cholesterol

BGSC Bis-guanidinium-spermidine-cholesterol

BGTC Bis-guanidinium-tren-cholesterol,

- DOTAP (1,2-dioleoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium chlorid  
DOSPER (1,3-dioleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propylamid)  
DOTMA (1,2-dioleoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium chlorid)  
(Lipofectin®)
- 5 DORIE (1,2-dioleoyloxypropyl)-3 dimethylhydroxyethyl ammoniumbromid)  
DOSC (1,2-dioleoyl-3-succinyl-sn-glycerol cholinester)  
DOGSDSO (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-succinyl-2hydroxyethyl disulfide  
ornithin),
- 10 DDAB Dimethyldioctadecylammonium bromid  
DOGS ((C18)<sub>2</sub>GlySper3<sup>+</sup>) N,N-dioctadecylamido-glycyl-spermin  
(Transfectam®)  
(C18)<sub>2</sub>Gly<sup>+</sup> N,N-dioctadecylamido-glycin  
DOEPC 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholin oder andere O-  
15 Alkyl-Phosphatidylcholin oder-ethanolamine,  
sowie von allen genannten Lipiden mit ungesättigten Fettsäure-  
und/oder Fettalkoholketten deren gesättigte Derivate mit  
Dimyristoyl-, Dipalmitoyl-, oder Distearoylketten.
- 20 Bevorzugte kationische Lipide zur Ausführung der Erfindung umfassen  
Cholesteryl 3β-N-(Dimethyl-aminoethyl)carbamat (DC-Chol), 3-β-[N-  
(N,N'-dimethylaminoethane) carbamoyl]cholesterol (DAC-Chol), (N-[1-  
(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium Salz (DOTAP).

- In einer bevorzugten Zusammensetzung werden gesättigte synthetische  
Phosphatidylcholone, wie DMPC, DPPC oder DSPC, Cholesterin, die  
kationischen Lipide DC-Chol, DAC-Chol oder DOTAP verwendet, wobei  
ganz besonders bevorzugt der Anteil der kationischen Lipide zwischen  
5 und 20mol% beträgt und der Anteil aller sterolbasierten Lipide  
30 zwischen 35 und 60% beträgt:

Die Größe der Liposomen variiert von 20-1000 nm, bevorzugt von 50-  
800 nm und ganz besonders bevorzugt von 50-300 nm.

35

Die Erfindung betrifft auch Verfahren zum Einschluss der Wirkstoffe  
in Liposomen. Für den Einschluss des gewünschten Wirkstoffes in die  
Liposomen wird dieser in einer Pufferlösung gelöst, mit welcher dann

die Liposomen hergestellt werden. Der Einschluss kann passiv, oder mittels des Advanced Loading Verfahrens erfolgen. Während das passive Einschliessen von Molekülen in Liposomen dem Fachmann bekannt ist, ist das Advanced Loading Verfahren in WO 01/34115 A2 beschrieben, deren Offenbarungsgehalt an dieser Stelle mitaufgenommen wird.

Der passive Einschluss wird bevorzugt dann verwendet, wenn große Mengen eines gut löslichen Wirkstoffes eingeschlossen werden sollen.

10. Dafür werden Liposomen mit einer Lipidkonzentration von 30 bis 150 mM, bevorzugt mit einer Lipidkonzentration von 50 bis 120 mM und ganz besonders bevorzugt einer Lipidkonzentration von 80 bis 110 mM in Gegenwart des gelösten Wirkstoffes hergestellt. Die Einschlusseffizienz wird beim passiven Einschluss mit zunehmender  
15 Lipidkonzentration gesteigert, da das von der Lipiddoppelschicht umschlossene Flüssigkeitsvolumen zunimmt.

Um hohe Einschlusseffizienzen zu erzielen, wird der Wirkstoff in einer weiteren Ausführung der Erfindung mittels des Advanced Loading  
20 Verfahrens in die Liposomen eingeschlossen. Dieses Verfahren wird bevorzugt dann verwendet, wenn der Wirkstoff möglichst effizient und damit z.B. kostensparend in die Liposomen eingeschlossen werden soll. Bei diesem Verfahren, das auf eine Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und membranbildenden Substanzen beruht, wird bei niedrigen  
25 Ionenstärken und bei einem pH-Wert gearbeitet, bei welchem der Peptid- oder Proteinwirkstoff in einem anionischen Ladungszustand vorliegt. Für viele Proteine oder Peptide ist das unter physiologischen Bedingungen, d.h. bei einem pH-wert zwischen 7 und 8 der Fall. Die Ladung der Wirkstoffe bei einem gegebenen pH kann aus  
30 Datenbanken entnommen werden, etwa der SWISS-PROT oder lässt sich nach bekannten Algorithmen berechnen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird das passive Einschlussverfahren mit dem Advanced Loading Prozess kombiniert. Bei  
35 diesem Verfahren wird der Advanced Loading Prozess mit einer Lipidkonzentration von 30 bis 150 mM, bevorzugt mit einer Lipidkonzentration von 50 bis 120 mM und ganz besonders bevorzugt einer Lipidkonzentration von 80 bis 110 mM durchgeführt, um die



Einschlussraten gegenüber den einzelnen Verfahren signifikant zu erhöhen.

5. Nach der Liposomenpräparation mittels des Advanced Loadings oder des kombinierten Verfahrens wird aussen an der Liposomenmembran anhaftender Wirkstoff von der Oberfläche der Liposomen entfernt. Das geschieht durch eine Auflösung der bestehenden Wechselwirkung beispielsweise durch Änderung des pH-Wertes oder Erhöhung der Ionenstärke.

10

Um einen „burst release“ zu minimieren, muss nicht eingeschlossener Wirkstoff abgetrennt werden. Dazu werden geeignete Trennverfahren verwendet, so dass der Wirkstoff zu mindestens 90% im Liposom 15 eingeschlossen ist und weniger als 10% des Wirkstoffes sich ausserhalb des Liposoms befinden. Hierfür können chromatographische Verfahren, Zentrifugation, Dialyse oder Ultrafiltration verwendet werden.

20 In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung werden pH-sensitiv kationische Lipide eingesetzt, wie sie in WO 02 066490 und US 5965434 beispielhaft offenbart sind. Solche Liposomen können durch pH-Wechsel in einen anderen Ladungszustand gebracht werden und ermöglichen so die einfache Abtrennung von aussen anhaftendem 25 Wirkstoff. Beispiele für pH-sensitiv kationische Verbindungen sind:

Histaminyl-Cholesterolhemisuccinat (His-Chol),  
Morpholin-N-ethylamino-cholesterolhemisuccinat (Mo-Chol).

30 Leuprolidacetat ([D-Leu<sup>6</sup>Pro<sup>9</sup>Des-Gly<sup>10</sup>]-LHRH Ethylamid) ist ein synthetisch hergestellter Agonist des LHRH (luteneizing hormone releasing hormone) und wird klinisch vor allem bei Prostatakrebs, Endometriose und vorzeitiger Pubertät eingesetzt, um den Androgenspiegel im Serum zu senken. Die kontinuierliche Gabe von 35 Leuprolidacetat führt zunächst zu einer Erhöhung des Testosteronspiegels, bevor dieser dann bis auf das Kastrationsniveau gesenkt wird. Der initiale Anstieg des Testosterons ist zurückzuführen auf eine Stimulation der LHRH Rezeptoren in der Hypophyse und der dadurch ausgelösten Ausschüttung von LH, welches

wiederum die Testosteronproduktion im Hoden stimuliert. Nach der anfänglichen Stimulation durch Leuprolidacetat kommt es schließlich zu einer Desensibilisierung der Rezeptoren in der Hypophyse, wodurch die Ausschüttung von LH inhibiert wird. Dies führt dann zu einer Absenkung des Testosteronspiegels.

In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung wird Leuprolidacetat als Wirkstoff eines erfindungsgemäßen Depotsystems verwendet.

In weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Antigene oder Antigenfragmente als Wirkstoffe eines erfindungsgemäßen Depotsystems zur Vakzinierung verwendet.

In einer weiteren Ausführungsform werden therapeutisch nutzbare Insuline als Wirkstoffe für ein erfindungsgemäßes Abgabesystem eingesetzt.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert, ohne auf diese Ausführungen begrenzt zu sein.

#### Beschreibung der Abbildungen

##### Abbildung 1

Vergleich der liposomalen Depotsysteme aus Beispiel 4 der vorliegenden Erfindung mit der injizierten Kontrollprobe (K 3) im Tiermodell

##### Abbildung 2

Vergleich der liposomalen Depotsysteme mit Leuprolidacetat aus Beispiel 4 der vorliegenden Erfindung mit der injizierten Kontrollprobe (P29) im Tiermodell (Serumspiegel Leuprolidacetat)

##### Abbildung 3

Vergleich der liposomalen Depotsysteme mit Leuprolidacetat aus Beispiel 4 der vorliegenden Erfindung mit der injizierten Kontrollprobe (P29) im Tiermodell (Serumspiegel Testosteron)

## Beispiele

## Beispiel 1

## Einschluss von Insulin in Liposomen

5 Lipidmischungen folgender Zusammensetzung

Formulierung	Zusammensetzung
I-1	DPPC/DC-Chol/Chol 60:10:30 (mol%)
I-2	DPPC/DOTAP/Chol 50:10:40 (mol%)

10 wurden bei 50 °C in Chloroform gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet. Der Lipidfilm wird mit soviel Human-Insulin-Lösung (rekombinantes Insulin) (4mg/ml Insulin in 10mM HEPES, 300 mM Sucrose, pH 7,5) versetzt, dass eine 50mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese Suspension durch Schwenken über 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C hydratisiert und für 15 weitere 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Danach wird die Suspension eingefroren. Es folgen 3 Einfrier- und Auftauprozesse, wobei nach dem Auftauen jeweils eine 5-minütige Behandlung im Ultraschallbad erfolgt.

20 Nach dem letzten Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch eine Membran mit einer Porenweite von 200nm oder 400nm extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonat-Membran mit einer Porenweite von 200 oder 400nm). Nach der Extrusion wird die erhaltene Suspension durch Zugabe einer Stammlösung Glycin-HCl, pH 3,5 und NaCl umgepuffert. Nach einer Filtration der Liposomen durch 0,8 µm 25 erfolgt die Abtrennung des nicht-eingeschlossenen Insulins durch dreimalige Sedimentation in der Ultrazentrifuge bei 60000x g, 45 min. Durch Zugabe einer HEPES- Stammlösung, pH 7,5 wird wieder ein physiologischer pH eingestellt. Die Menge des eingeschlossenen Insulins wird nach einer Extraktion mit CHCl<sub>3</sub> und CH<sub>3</sub>OH mittels RP- 30 HPLC bestimmt. Es ergeben sich Einschlussraten von 80-100 % Insulin.

12

**Beispiel 2****Einschluss von Alkalischer Phosphatase (AP) in Liposomen**

Eine Lipidmischung der folgender Zusammensetzung:

Formulierung	Zusammensetzung
AP-1	DPPC/DOTAP/Chol 50:10:40 (mol%)

wird bei 50 °C in Chloroform gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet. Der Lipidfilm wird mit soviel AP-Lösung (from bovine intestinal mucosa) (5 mg/ml AP in 10mM HEPES, 300 mM Sucrose, pH 7,5) versetzt, dass eine 50mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese Suspension für 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C unter Schwenken hydratisiert und für weitere 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Danach wird die Suspension eingefroren. Es folgen 3 Einfrier- und Auftauprozesse, wobei nach dem Auftauen jeweils eine 5-minütige Behandlung im Ultraschallbad erfolgt.

Nach dem letzten Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch eine Membran mit einer Porenweite von 200nm oder 400nm extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonat-Membran mit einer Porenweite von 200 oder 400nm). Nach der Extrusion wird die Ionenstärke der erhaltenen Suspension durch Zugabe einer Stammlösung NaCl verändert. Die Abtrennung der nicht-eingeschlossenen AP erfolgt durch dreimalige Sedimentation in der Ultrazentrifuge bei 60000 x g über 45 min. Die Menge der eingeschlossenen AP wird nach einer organischen Fällung mit CHCl<sub>3</sub> und CH<sub>3</sub>OH mittels eines Protein-Assays (BCA Protein Assay Reagent Kit, Perbio) ermittelt. Darüberhinaus wird die Aktivität der eingeschlossenen AP mittels eines Enzymassays (p-Nitrophenylphosphat Test) bestimmt. Es ergeben sich Einschlussraten von 40-50 % AP.

13

**Beispiel 3****Einschluss von Inulin in Liposomen**

Lipidmischungen folgender Zusammensetzung:

---

**Formulierung      Zusammensetzung**

---

P-20              DPPC/DC-Chol/Chol  
                    60:10:30 (mol%)

P-21              DPPC/DOTAP/Chol  
                    50:10:40 (mol%)

P-23              DPPC/DPPG  
                    40:60 (mol%)

---

5                      werden bei 50 °C in Chloroform gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet. Der Lipidfilm wird mit soviel <sup>3</sup>H-Inulin-Lösung (18,5 MBq/ml <sup>3</sup>H-Inulin in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5) versetzt, dass eine 100mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese Suspension für 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C unter Schwenken hydratisiert. Danach wird die Suspension eingefroren. Es folgen weitere 3 Einfrier- und Auftauprozesse.

15                    Nach dem dritten Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch eine Membran mit einer Porenweite von 200 nm extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonat-Membran mit einer Porenweite 200 nm). Die Abtrennung des nicht-eingeschlossenen <sup>3</sup>H-Inulins erfolgt über eine Gelfiltration (G75-Säule, Pharmacia). Die Menge des eingeschlossenen <sup>3</sup>H-Inulins wird nach der Abtrennung im Scintillationszähler bestimmt. Es ergeben sich Einschlussraten von 10-25 % <sup>3</sup>H-Inulin.

**Beispiel 4****Einsatz von liposomalen Depotsystemen im Tiermodell**

Die verschiedenen Liposomen nach Beispiel 3 wurden in einer  
5 Konzentration von 20mM Lipid in einem Volumen von 0,5mL subkutan in  
gesunde Ratten (3 Tiere pro Gruppe) injiziert. Eine Kontrollprobe  
mit Leerliposomen und nicht verkapseltem  $^3\text{H}$ -Inulin wurde ebenfalls in  
einem Volumen von 0,5 mL subkutan verabreicht. Die  
pharmakokinetischen Daten wurden durch Blutabnahmen zu verschiedenen  
10 Zeitpunkten gewonnen. Die gesamte Versuchsdauer der Tierstudie  
betrug 6 Wochen. Das Allgemeinbefinden aller Tiere war über die  
Versuchsdauer gut. Nur ein Tier der Gruppe P20 zeigte am Versuchstag  
10 für ca. 1h starke Atemgeräusche.

Die Inulingehalte wurde Verbrennen der Blutproben (Oxidizer Ox 500,  
15 Zinser) und anschliessender Scintillationsmessungen bestimmt.

Die Formulierungen und die relativen Bioverfügbarkeiten bis  $t=42$  d  
sind in folgender Tabelle dargestellt:

Formulierung	Zusammensetzung	Relative Bioverfügbarkeit bis $t=42$ Tage [%]
K-3	DPPC/DPPG/Chol 50:10:40 (200 nm) + $^3\text{H}$ -Inulin aussen	100
P-20	DPPC/DC-Chol/Chol 60:10:30 (200 nm)	136,5
P-21	DPPC/DOTAP/Chol 50:10:40 (200 nm)	120
P-23	DPPC/DPPG 40:60 (200 nm)	142

**Beispiel 5****Einschluss von Leuprolidacetat in Liposomen**

Lipidmischungen der folgenden Zusammensetzung:

Formulierung	Zusammensetzung
P-26	DPPC/DC-Chol/Chol 60:10:30 (mol%)
P-27	DPPC/DOTAP/Chol 50:10:40 (mol%)

werden bei 50 °C in Chloroform gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet. Der Lipidfilm wird mit soviel Leuprolidacetat-Lösung (95 mg/ml in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 6) versetzt, dass eine 100 mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese Suspension für 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C unter Schwenken hydratisiert. Danach wird die Suspension eingefroren. Es folgen weitere 3 Einfrier- und Auftauprozesse.

Nach dem letzten Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch eine Membran mit einer Porenweite von 400 nm extrudiert (Avestin LiposoFast, Polycarbonat-Membran mit einer Porenweite 400 nm). Die Abtrennung des nicht-eingeschlossenen Leuprolidacetats erfolgt durch dreimalige Sedimentation in der Ultrazentrifuge bei 60000 x g über 45 min. Die Menge des eingeschlossenen Leuprolidacetats wird nach einer Extraktion mit CHCl<sub>3</sub> und CH<sub>3</sub>OH mittels RP-HPLC bestimmt. Es ergeben sich Einschlussraten von ca. 15 % Leuprolidacetat.

16

**Beispiel 6****Einsatz von liposomalen Depotsystemen im Tiermodell**

Die verschiedenen Liposomen nach Beispiel 5 wurden in einer Konzentration von 25-30mM Lipid in einem Volumen von 0,5mL subkutan in gesunde männliche Ratten (3 Tiere pro Gruppe) injiziert. Eine Kontrollprobe mit Leerliposomen und nicht verkapseltem Leuprolidacetat wurde ebenfalls in einem Volumen von 0,5 mL subkutan verabreicht. Die pharmakokinetischen Daten wurden erhalten durch Blutabnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten, das Gewinnen von Serum und die Bestimmung der Leuprolidacetatkonzentration im Serum mittels ELISA (Peninsula).

Da Leuprolidacetat den Testosteronspiegel der männlichen Ratten beeinflusst, wurde die Testosteronkonzentration im Serum ebenfalls über den gesamten Zeitraum mittels ELISA (DRG) bestimmt. Die gesamte Versuchsdauer der Tierstudie betrug 6 Wochen. Das Allgemeinbefinden aller Tiere war über die Versuchsdauer gut. Die Formulierungen und die relativen Bioverfügbarkeiten bis t=42 d sind in folgender Tabelle dargestellt:

20

Formulierung	Zusammensetzung	Größe [nm]	Relative Bioverfügbarkeit bis t=42 Tage [%]
P-29	DPPC/DC-Chol/Chol 60:10:30 + Leuprolid aussen	290	100
P-26	DPPC/DC-Chol/Chol 60:10:30	305	117
P-27	DPPC/DOTAP/Chol 50:10:40 (200 nm)	282	98

25



17

## Patentansprüche

1. Abgabesystem zur verzögerten Wirkstofffreisetzung, dadurch gekennzeichnet, dass es Liposomen enthaltend neutrale und kationische Lipide, sowie einen Wirkstoff umfasst.
2. Abgabesystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen pH-sensitiv kationische Lipide umfassen.
3. Abgabesystem nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Wirkstoff ein therapeutisches Peptid oder Protein umfasst.
4. Abgabesystem nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Wirkstoff zu mindestens 90% im Liposom eingeschlossen ist und weniger als 10% sich außerhalb des Liposoms befindet.
5. Abgabesystem zur verzögerten Wirkstofffreisetzung nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Abgabe des Wirkstoffes mindestens 1 Woche anhält.
6. Abgabesystem nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen
  - aus gesättigten synthetischen Phosphatidylcholinen, ausgewählt aus der Gruppe DMPC, DPPC und/oder DSPC,
  - aus Cholesterol,
  - die kationischen Lipide ausgewählt aus der Gruppe DC-Chol, DAC-Chol und/oder DOTAPzusammengesetzt sind.
7. Abgabesystem nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die kationischen Lipide pH-sensitiv kationisch sind und ausgewählt aus der Gruppe His-Chol und/oder Mo-Chol.

8. Abgabesystem nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Anteil der kationischen Lipide zwischen 5 und 20mol% beträgt und der Anteil aller sterolbasierten Lipide zwischen 35 und 60% beträgt.

9. Abgabesystem nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Größe der Liposomen variiert von 20-1000 nm, insbesondere von 50-800 nm, bevorzugt von 50-300 nm.

10. Verfahren zur Herstellung eines liposomalen Depots mit kationischen Lipiden dadurch gekennzeichnet, dass
- Liposomen in Gegenwart einer wässrigen Wirkstofflösung hergestellt werden, wobei Lipidkonzentrationen von 50 bis 120mM, bevorzugt von 80 bis 110 mM verwendet werden,
  - nichteingeschlossener, überschüssiger Wirkstoff von den Liposomen abgetrennt wird.

11. Verfahren zur Herstellung eines liposomalen Depots mit kationischen Lipiden dadurch gekennzeichnet, dass
- Liposomen in Gegenwart von Wirkstoff hergestellt werden, wobei bei einem pH-Wert gearbeitet wird, bei welchem der Peptid- oder Proteinwirkstoff in einem anionischen Ladungszustand vorliegt,
  - nach der Herstellung an der Aussenseite der Membran haftender Wirkstoff durch eine Veränderung des pH-Wertes oder einer Erhöhung der Ionenstärke abgelöst wird,
  - nichteingeschlossener, überschüssiger Wirkstoff von den Liposomen abgetrennt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass Lipidkonzentrationen von 50 bis 120 mM, bevorzugt von 80 bis 110 mM verwendet werden.

13. Verwendung des Abgabesystems nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung eines Arzneimittels.

14. Verwendung des Abgabesystems nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur subkutanen oder intramuskulären Applikation.
15. Verwendung des Abgabesystems nach einem oder mehrerer der Ansprüche 1 bis 9 für ein Depot von LHRH-Agonisten oder GnRH-Analoga dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen
  - aus DPPC, Cholesterol,
  - aus den kationischen Lipide DC-Chol oder DOTAP aufgebaut sind und
  - LHRH-Agonisten oder GnRH-Analoga wie Leuprolidacetat, Buserelin, Goserelin oder Triptorelin als Wirkstoff enthalten.
16. Verwendung eines Abgabesystems nach Anspruch 15 für ein Depot für Insulin dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen ein therapeutisch nutzbares Insulin enthalten.
17. Verwendung eines Abgabesystems nach einem oder mehrere der Ansprüche 1 bis 9 für ein Depot von Heparin dadurch gekennzeichnet, dass die Liposomen Heparin enthalten.
18. Verwendung des Abgabesystems nach einem oder mehrerer der Ansprüche 1 bis 9 für ein Depot von Antigenfragmenten zur Vakzinierung.

20

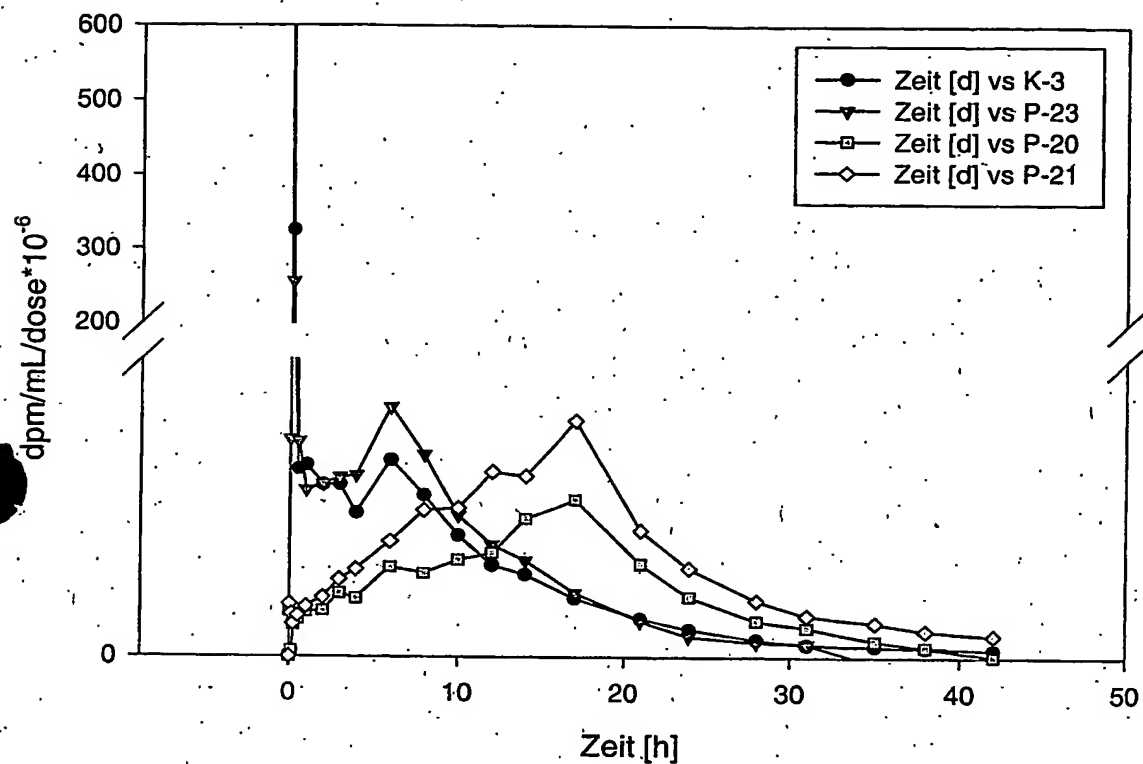


Abbildung 1

5

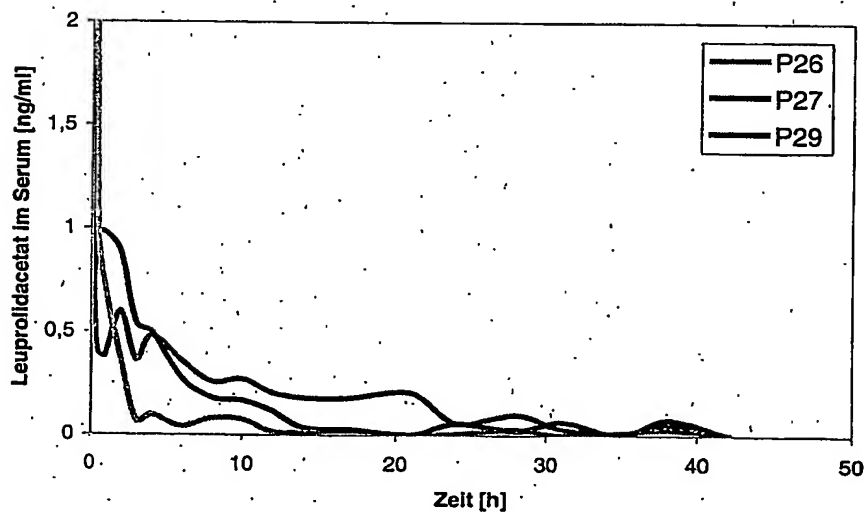


Abbildung 2

10

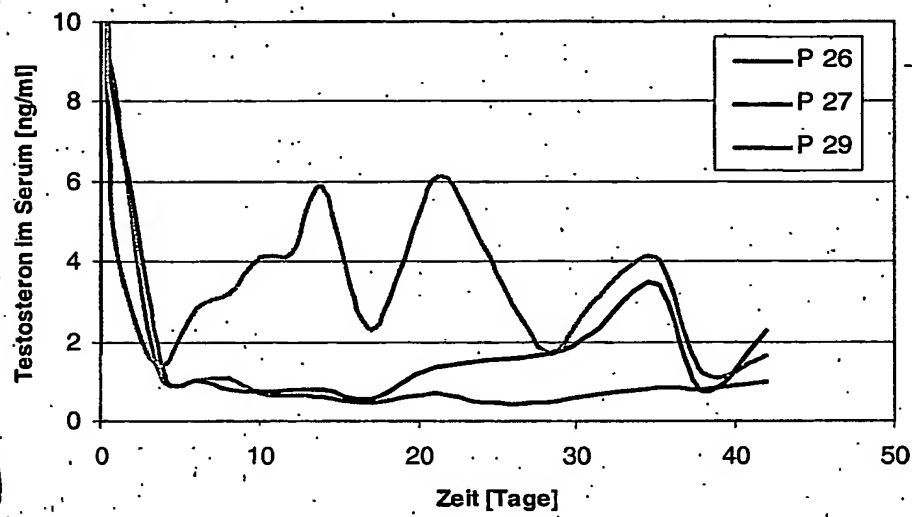


Abbildung 3

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**